

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

10/509712




REC'D 14 MAY 2003

Prioritätsbescheinigung über die **Einreichung** PCT  
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

102 14 019.7

Anmeldetag:

30. März 2002

Anmelder/Inhaber:

Dr. Detlef P. Müller-Schulte, Aachen/DE

Bezeichnung:

Lumineszierende, sphärische, nicht autofluoreszieren-  
de Silicagel-Partikel mit veränderbaren Emissionsin-  
tensitäten und -frequenzen

IPC:

C 09 K, C 12 Q, G 01 N.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der  
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 10. März 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Joost

## **Lumineszierende, sphärische, nicht autofluoreszierende Silicagel-Partikel mit veränderbaren Emissionsintensitäten und -frequenzen**

Erfinder: Müller-Schulte; Detlef, Dr. 52074 Aachen, DE

### **Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft lumineszierende, sphärische Mikro- und Nanopartikel mit veränderbaren Lumineszenzintensitäten, ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie deren Verwendung.

Als Lumineszenz wird im folgenden die Emission von Licht des gesamten Spektralbereichs durch Stoffe definiert, die zuvor durch Energieabsorption angeregt wurden. Die Fluoreszenz und Phosphoreszenz fallen gleichfalls unter diesen Begriff.

Lumineszierende Stoffe werden heute in Form fluoreszierender oder phosphoreszierender Substanzen im gesamten Bereich der biochemischen und medizinischen Analytik bzw. Diagnostik routinemäßig zum Nachweis von Analyten wie Proteine, Peptide, Toxine oder Nukleinsäuren sowie als Marker zur Sichtbarmachung von Zellen, Zellkompartimenten oder zur Erfassung biologischer Prozesse eingesetzt.

Ein besonders interessante und zukunftssträngige Nutzung der Lumineszenz-Methodik ergibt sich bei der sogenannten Array-Technik zum Nachweis von Biomolekülen. Unter Array-Technik versteht man im Bereich der heutigen Bioanalytik und Diagnostik flache Glas- oder Polymerträger bzw. Substrate - auch als Biochips bezeichnet -, auf denen in rasterartiger Anordnung eine Vielzahl von Biomolekülsonden (Nukleinsäuren, Proteine oder Peptide) bekannter Struktur aufgebracht sind. Durch Inkubation Lumineszenz-markierter Protein- bzw. Nukleinsäureproben, die zuvor z.B. aus Gewebe oder Zellen gewonnen wurden, mit dem Biochip kommt es an den Stellen auf seiner Oberfläche zu einer spezifischen Bindung, die ein zur Probe komplementäre chemisch-physikalische Struktur aufweist. Aufgrund der

Lumineszenzmarkierung der Probe resultiert an der Bindungsstelle eine detektierbare Lumineszenz, die eine direkte Information über die chemische und physikalische Struktur der Probe liefert. Infolge der hohen Anzahl der auf dem Chip immobilisierbaren Sonden stellt die Array-Technologie ein wertvolles Werkzeug auch für die Austestung von Molekülbibliotheken im Zuge der Pharmaka-Entwicklung dar.

Da die Qualität und die Anwendbarkeit der Chip-Technologie unmittelbar von der Nachweispffindlichkeit sowie der spektralen Spezifität der Lumineszenzmarkers abhängt, wurden in der Vergangenheit vielfältige Entwicklungen in Richtung neuer, verbesserter Lumineszenzsysteme unternommen, um so die Nachweisgrenzen für den Bioassay entscheidend zu reduzieren.

Die Entwicklung lumineszierender Substanzen betrifft vorwiegend zwei Stoffklassen. Bei der einen handelt es sich um lumineszierende Moleküle, deren bekannteste Vertreter Fluorescein, Rhodamin, Phycoerythrin, Coumarin, Cy3, Cy5, TAMRA, ROX, Oregon Green, Ethidiumbromid, Texas Red und Dabcyl sind (bei diesen Namen handelt es sich durchweg um Handelsnamen). Die andere Verbindungsklasse stellen die vornehmlich aus den Gruppen IIB und VIA, IIIA und VA oder IVA des Periodensystems gebildeten Halbleiter-Nanokristalle dar, deren bekannteste Vertreter CdS, CdSe, CdTe, ZnS und ZnSe sind. Ein besonderes Merkmal dieser Halbleiter-Nanokristalle ist zum einen die hohe Quantenausbeute, zum anderen neigen sie im Gegensatz zu den herkömmlichen Lumineszenzfarbstoffen praktisch nicht zum Ausbleichen. Ein weiterer bemerkenswerter Punkt, der die in der Literatur als „quantum dots“ bezeichneten Verbindungen zu einer interessanten Alternative zu den herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoffen hat werden lassen, ist die Umstand, daß das Absorptions- und Emissionsverhalten der quantum dots größenabhängig ist. D.h. konkret: mit abnehmender Teilchengröße verschiebt sich das Emissionsspektrum in den kürzerwelligen Bereich und umgekehrt.

Für die Entwicklung eines Bioassays unter Nutzung des Lumineszenzeffektes eröffnet das zusätzlich die Möglichkeit, unterschiedliche Lumineszenz-Markierungen nicht allein über die Substanzwahl, sondern auch über die Teilchengröße vorzunehmen. Dies bietet eine hervorragende Basis zur optischen Kodierung von Biomolekülen im Rahmen der Bioarray-Entwicklung.

Die Verwendung von Fluoreszenzmarkern in der Bioanalytik ist vielfältig in der Literatur beschrieben.

unterschiedlichen Fluorophoren markierten Rezeptoren offenbart, wobei der Energietransfer vom angeregten ersten Fluorophor auf den zweiten Fluorophor durch die Abwesenheit des zu detektierenden Liganden reduziert wird.

Gegenstand des US Patentes 5,324,633 sind Bioarray-Methoden zur Erfassung von an Biopolymeren gebundene Fluoreszenz-markierte Rezeptoren mit Hilfe eines Photonenzählers oder der konfokalen Mikroskopie.

Xanthen-Fluoreszenz-Farbstoffe mit einer Anregungsfrequenz von 450-650 nm zur Zelldetektion mit Hilfe markierter Antikörper sind im US Patent 5,066,580 ausgeführt.

In den US Patenten 3,998,943, 3,996,345, 4,174,384, 4,199,559 und 4,261,968 werden Liganden-Rezeptorassays offenbart, deren Grundprinzip in der Markierung eines Rezeptors und/oder Liganden mit einem Fluoreszenzfarbstoff besteht, dessen Emissionsverhalten in Abhängigkeit von der Liganden-Rezeptorbindung detektiert wird.

Im US Patent 5,319,209 sind Fluoreszenz-Sonden u.a. in Form von Benzofuran-isophthalat offenbart, die zur Messung von Ionenkonzentrationen in Zellen geeignet sind.

Die Herstellung von Halbleiter-Nanokristallen bzw. quantum dots mit den entsprechenden optischen Eigenschaften ist allgemeiner Stand der Technik und in der Literatur divers beschrieben: Kortan et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 112, 1327, 1990; Colvin et al., Nature, Vol. 370, 354, 1994; Murray et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 115, 8706, 1993; Hirai et al., J. Phys. Chem. B, Vol. 103, 4228, 1999; Dabbousi et al., J. Phys. Chem. B, Vol. 101, 9463, 1997; Hines et al., J. Phys. Chem. Vol. 100, 468, 1996; Dank et al., Chem. Mater. Vol. 8, 173, 1996; Steigerwald et al., J. Am. Chem. Soc. (1988) 110: 3046-3050 und Lianos et al., Chem. Phys. Lett. Vol. 125, 299, 1986.

Für die Anwendung lumineszierender Substanzen in der Bioanalytik ist die eigentliche Synthese jedoch nicht allein ausschlaggebend, mitentscheidend ist parallel die Möglichkeit, die Lumineszenz-Marker an die entsprechenden Biosubstanzen kovalent zu binden. Bei Lumineszenzfarbstoffen werden funktionelle Gruppen vorwiegend in Form von N-Hydroxysuccinimidyl-Estern oder Isothiocyanat-Funktionen eingeführt, die mit den Aminogruppen der Biomoleküle eine Bindung eingehen.

Die Funktionalisierung der quantum dots geschieht dagegen grundsätzlich nach zwei Verfahrensweisen: zum einen werden die Oberflächen mit funktionellen Mercaptoverbindungen

... J. Am. Chem. Soc. Vol. 122, 12142, 2000; Chan et al., Science Vol. 281, 2016, 1998; Mitchell et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 121, 8122, 1999) oder die quantum dots werden in eine Polymermatrix oder Dendrimere eingekapselt („capping“). Lemon et al. (J. Am. Chem. Soc. Vol. 122, 12886, 2000), Sooklal et al. (Adv. Mater. Vol. 10, 1083, 1998) und Lakowicz et al. (J. Phys. Chem. Vol. 103, 7613, 1999) beschreiben die Einkapselung der Halbleiter-Nanokristalle mit Hilfe von Polyamidoamin-Dendrimern. Einkapselungen unter Zuhilfenahme von Polystyrol-co-Vinylpyridin, Polystyrol, Silicagel oder Polylaurylmethacrylat werden von Zhao et al. (Chem. Mater. Vol. 14, 1418, 2002), Han et al. (Nature Biotech., Vol. 19, 631, 2001), Correa-Duarte et al. (Chem. Phys. Letters, Vol. 286, 497, 1998) ...

... und Lee et al. (Adv. Mater., Vol. 12, 2000) beschrieben. Quantum dots, die mit Mercaptokomponenten und Diaminocarboxylsäuren umhüllt sind sowie Halbleiter-Nanokristalle, die in der Gasphase mit Hilfe eines Sprühsystems hergestellt werden, sind Gegenstand der US Patente 6,114,038 und 5,906,670.

Die Herstellung von Halbleiter-Nanokristalle aus der Gruppe III-V und II-VI, die zur Kopplung von Affinitäts-Liganden befähigt sind, gehen aus den US Patenten 6,207,397, 5,251,018, 5,751,018, 5,262,357 und 5,505,928 hervor.

Gegenstand der US Patente 6,326,144 und 6,207,229 sind beschichtete Halbleiter-Nanokristalle mit einer Affinitätsbindung zu biologischen Komponenten bzw. monodisperse, mit ZnS, ZnSe, CdS oder CdSe beschichtete lichtemittierende Nanokristalle.

US Patente 5,293,050 und 5,354,707 offenbaren lichtemittierende Halbleiterschichten aus Silicon für Schaltkreise, in denen die zweite Silicon-Schicht mindestens einen quantum dot enthält.

In US Patent 5,525,377 werden 20 bis 100 Å große, mit Polymethylmethacrylaten beschichtete Nanopartikel aus dotierten Halbleiter-Verbindungen für den Einsatz als Kathodenstrahlröhren oder Elektrolumineszenz Displays beschrieben.

Die Verwendung von Halbleiter-Nanokristallen in Form von ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe, HgS, HgSe, HgTe, GaS, InAs, InP und InSb als Elektronen-Transportmedium zur Herstellung von Elektrolumineszenz-Geräten, die bei angelegter Spannung sichtbares Licht verschiedener Wellenlängen emittieren, gehen aus dem US Patent 5,537,000 hervor.

Mit Übergangsmetallen dotierte laserverstärkende Kristalle, bestehend aus Gruppe II und VI, sind Gegenstand des US Patentes 5,541,948.

*Eine mit Lumineszenz-Nanokristallen dotierte Glasmatrix wird im US Patent 5,585,640 beschrieben. Zur Herstellung der dotierten vorgefertigten Glasformen werden Temperaturen über 1000 °C benötigt.*

US Patent 5,770,299 offenbart Halbleiter-Nanokristalle bestehend aus CdS und/oder III-V Komponenten oder II-VI Halbleiter-Nanokristalle als Pigmente für Anstrichfarben.

Eine Festphasen-Synthese von Fluoreszenz-markierten Peptid-Bibliotheken auf kommerziellen Silicagel-Beads werden im US Patent 5,789,162 beschrieben.

Lumineszenz-Halbleiter-Nanokristall Sonden für biologische Applikationen, die mit Silanderivaten beschichtet und Affinitäts-Moleküle zu binden befähigt sind, sind im US Patent 5,990,479 ausgeführt.

US Patent 5,043,265 offenbart Fluoreszenz Partikel in Form von ZnS-Ag und Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Eu als Label für Immunglobuline und Polynukleotide.

Die Herstellung von Nanopartikeln aus Übergangsmetallen, Lanthaniden oder Actiniden in Gegenwart eines in einer inerten Gelpolymeren dispergierten, in Form von Nukleinsäure oder Proteinen vorliegenden Kationenaustauscher, ist Gegenstand des US Patents 5,985,353. Durch Zugabe entsprechender Anionen werden die an den Austauschern gebundenen Kationen zu Nanopartikeln ausgefällt.

Phycobiliprotein-Marker, die den Grad der spektralen Überlappung zwischen der Anregungs- und Emissionsfrequenz reduzieren können, entsprechend einer deutlichen Stokes-Verschiebung, sind im US Patent 4,666,862 sowie von Oi et al. (J. Cell. Biol. Vol. 93, 891 1982) beschrieben.

Eine weitere Gruppe lichtemittierender Substanzen stellen die sogenannten up-converting phosphors dar, deren Besonderheit in der Emission kürzerwelliger Strahlung gegenüber der Anregungsstrahlung besteht. Substanzen dieser Art setzen sich weitgehend aus Verbindungen des Sauerstoffs und/oder Schwefels und/oder Fluors mit den Lanthanoiden, oder Yttrium zusammen. Für die Verwendung im Bioassay haben diese Substanzen den Vorteil, daß ihre Absorptions- und Emissionsfrequenzen nicht durch Autofluoreszenz der Trägersysteme wie Trägerpartikel oder Mikrotiterplatten gestört werden, ein Phänomen, das in der heutigen Bioanalytik bei der Verwendung von Trägersystemen jedweder Art ein nach wie vor ungelöstes Problem darstellt. In den US Patenten 5,674,698 und 5,698,397 sind eine Reihe von Molekül-Sonden in Form dotierter up-converting phosphore wie z.B. Na-Yttriumfluorid, Na-Yttriumfluorid, Lanthanfluorid, Gadoliniumfluorid und Yttriumoxysulfide beschrieben, die mittels Laseranregung in biologischen sowie anderen Assays genutzt werden.

entsprechenden Biomoleküle gekoppelt werden (Gerion et al., J. Phys. Chem. Vol. 105, 8861, 2001; Mattoussi et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 122, 12142, 2000; Chan et al., Science Vol 281, 2016, 1998; Mitchell et al., J. Am. Chem. Soc. Vol. 121, 8122, 1999) oder die quantum dots werden in eine Polymermatrix oder Dendrimere eingekapselt („capping“). Lemon et al. (J. Am. Chem. Soc. Vol. 122, 12886, 2000), Sooklal et al. (Adv. Mater. Vol. 10, 1083, 1998) und Lakowicz et al. (J. Phys. Chem. Vol. 103, 7613, 1999) beschreiben die Einkapselung der Halbleiter-Nanokristalle mit Hilfe von Polyamidoamin-Dendrimern. Einkapselungen unter Zuhilfenahme von Polystyrol-co-Vinylpyridin, Polystyrol, Silicagel oder Polyaurylmethacrylat werden von Zhao et al. (Chem. Mater. Vol. 14, 1418, 2002), Han et al. (Nature Biotech., Vol. 19, 631, 2001), Correa-Duarte et al. (Chem. Phys. Letters, Vol. 286, 497, 1998), Chang et al. (J. Am. Chem. Soc. Vol. 116, 6739, 1994) und Lee et al. (Adv. Mater., Vol. 12, 1102, 2000) beschrieben. Quantum dots, die mit Mercaptokomponenten und Diaminocarboxylsäuren umhüllt sind sowie Halbleiter-Nanokristalle, die in der Gasphase mit Hilfe eines Sprühsystems hergestellt werden, sind Gegenstand der US Patente 6,114,038 und 5,906,670.

Die Herstellung von Halbleiter-Nanokristalle aus der Gruppe III-V und II-VI, die zur Kopplung von Affinitäts-Liganden befähigt sind, gehen aus den US Patenten 6,207,397, 5,251,018, 5,751,018, 5,262,357 und 5,505,928 hervor.

Gegenstand der US Patente 6,326,144 und 6,207,229 sind beschichtete Halbleiter-Nanokristalle mit einer Affinitätsbindung zu biologischen Komponenten bzw. monodisperse, mit ZnS, ZnSe, CdS oder CdSe beschichtete lichtemittierende Nanokristalle.

US Patente 5,293,050 und 5,354,707 offenbaren lichtemittierende Halbleiterschichten aus Silicon für Schaltkreise, in denen die zweite Silicon-Schicht mindestens einen quantum dot enthält.

In US Patent 5,525,377 werden 20 bis 100 Å große, mit Polymethylmethacrylaten beschichtete Nanopartikel aus dotierten Halbleiter-Verbindungen für den Einsatz als Kathodenstrahlröhren oder Elektrolumineszenz Displays beschrieben.

Die Verwendung von Halbleiter-Nanokristallen in Form von ZnS, ZnSe, ZnTe, CdS, CdSe, CdTe; HgS, HgSe, HgTe, GaS, InAs, InP und InSb als Elektronen-Transportmedium zur Herstellung von Elektrolumineszenz-Geräten, die bei angelegter Spannung sichtbares Licht verschiedener Wellenlängen emittieren, gehen aus dem US Patent 5,537,000 hervor.

Mit Übergangsmetallen dotierte laserverstärkende Kristalle, bestehend aus Gruppe II und VI, sind Gegenstand des US Patentes 5,541,948.

Eine mit Lumineszenz-Nanokristallen dotierte Glasmatrix wird im US Patent 5,585,640 beschrieben. Zur Herstellung der dotierten vorgefertigten Glasformen werden Temperaturen über 1000 °C benötigt.

In Polyacrylat-Mikroträgern eingekapselte up-converting phosphor Partikel, die für die Anregungs- und Emissionsfrequenzen transparent sind und über funktionelle Gruppen Protein-Sonden kovalent binden können, sind im US Patent 5,132,242 ausgeführt.

Up-converting phosphore für die Detektion von Nukleinsäuresequenzen bzw. für den Immunoassay sind von Corstjens et al. (Clin. Chem. Vol. 47, 1885, 2001) und Niedbala et al. (Anal. Biochem. Vol. 293, 22, 2001), Silan-beschichtete up-converting phosphore von Hampl et al. (Anal. Biochem. Vol. 288, 176, 2001) beschrieben.

Lumineszierende Metallporphyrine, die zur Detektion von biologischen Substanzen verwendet werden können, sind Gegenstand des US Patentes 6,004,530.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Lumineszenzmarker in Form von Einzelmolekülen oder Nanokristallen haben den Nachteil, daß ihre Verwendung speziell für den Bioassay aufwendige Präparationen sowohl in bezug auf den zeitlichen als auch den verfahrenstechnischen Aufwand erfordern. So sind in der Regel Synthes- bzw. Präparationszeiten von mehreren Stunden bis hin zu mehreren Tagen (vgl. US Patent 5,132,242) in Verbindung mit aufwendigem verfahrenstechnischem Aufwand notwendig: Arbeiten unter Stickstoff-Inertgasatmosphäre, Destillationen, Arbeiten in organischen Medien. Darüber hinaus weisen die Produkte, sofern es sich um organische Polymere handelt, eine ausgeprägte Autofluoreszenz auf, vgl. Han et al., als Referenz oben aufgeführt.

Die gravierendste Einschränkung der bekannten Lumineszenz Systeme ist, daß in der Regel jeweils nur ein oder sehr wenige Lumineszenz Partikel (Halbleiter-Nanokristalle oder up-converting phosphor Kristall) pro zu markierendem Biomolekül gebunden werden. Diese Beschränkung reduziert konsequenterweise die Nachweisempfindlichkeit des Bioassays nachhaltig. Ähnliches gilt auch für Lumineszenzmoleküle, von denen auch nur eine sehr geringe Zahl pro Biomolekül gebunden werden können, so dass das von einem markierten Biomolekül ausgehende Signal schwierig ist zu detektieren. Hinzu kommt, daß durch die Kopplung der lumineszierenden Substanz an das Biomolekül (z.B. Antikörper) dieses inaktiviert werden kann. Bei den alternativ dazu entwickelten Lumineszenz-markierten Mikro- oder Nanopartikeln handelt es sich jedoch durchweg um auf der Oberfläche der Partikel gebundene Lumineszenzmarker, deren Herstellung, Anwendung und Detektion schwierig ist; vgl.: Fornusck und Votvicka, "Polymeric Microspheres as Diagnostic Tools for Cell Surface Marker Tracing," in CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 2, pp. 137-174, 1986. Der Artikel enthält eine kritische Übersicht über diese Technik, desweiteren, hier als Referenz angegeben:



Kaplan et al. (Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 728, 112, 1983) sowie die US Patente 3,853,987, 4,035,316, 4,105,598, 4,108,972, 4,224,198 und 4,326,008.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile der aus dem Stand der Technik bekannten Lumineszenz-Trägersysteme zu umgehen und lichtdurchlässige, nicht autofluoreszierende mikro- und submikropartikuläre Teilchen mit adaptierbarer Porosität bereitzustellen, die multiplexe lumineszierende Substanzen enthalten. Durch die Möglichkeit der Einkapselung einer Vielzahl lumineszierender Agenzien sowohl in Form von Molekülen als auch Nanopartikeln bzw. Kolloiden kann überraschenderweise die Nachweisempfindlichkeit für Biomoleküle im Rahmen der Bioanalytik und Diagnostik so gesteigert werden, daß die Möglichkeit zum Nachweis einzelner Moleküle möglich wird. Desweiteren kann durch die Einkapselung mehrerer Lumineszenz-Substanzen mit unterschiedlichem Emissionsverhalten eine Vielzahl optischer Kodierungen der Biomoleküle vorgenommen werden.

Diese Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch Einkapseln lumineszierender Substanzen in eine lichtdurchlässige Matrix aus Silicagel ermöglicht, die die grundsätzlichen Lumineszenz-Eigenschaften der Basissubstanz nicht beeinträchtigen.

Weiterhin wird diese Aufgabe gemäß der Erfindung durch ein inverses Suspensions-Verfahren gelöst, indem eine Mischung, bestehend aus einem Silicagel-Sol und der lumineszierenden Substanz, in einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase dispergiert und anschließend polykondensiert wird. Dadurch werden dreidimensional vernetzte poröse Polymerträger gebildet, die die Lumineszenz-Substanz eingekapselt enthält.

Silica-Sole werden nach den aus dem Stand der Technik allgemein bekannten Verfahren durch Hydrolyse von Alkoxysilanen mit Hilfe verdünnter Mineralsäuren (Dave et al. in: Immobilized Biomolecules in Analysis, Hrsg. Cass und Ligler, Oxford University Press, 1998; WO 02/09125 A1) hergestellt.

Als Alkoxysilane können Kieselsäureorthoester aliphatischer Alkohole eingesetzt werden, wobei bevorzugt Methyl-, Äthyl- oder Propylester einzeln oder als Mischungen verwendet werden. Zu dem Silica-Sol werden im zweiten Schritt die entsprechenden Lumineszenz-Substanzen zugegeben. Um das heterogene Sol-Lumineszenz-Substanz Gemisch homogener durchmischen zu können, wird die Reaktion in einem Ultraschallbad oder unter Zuhilfenahme einer Ultraschallsonotrode durchgeführt. Der Beschallungsvorgang dauert in der Regel eine halbe Minute. Die so gewonnene kolloiddisperse Mischung wird anschließend in einem organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittel in der Regel unter Rühren dispergiert. Dabei werden

perlförmige Sol-Tröpfchen gebildet, die durch anschließende Zugabe einer verdünnten Base zu dreidimensional vernetzten Silicagelen polykondensieren.

Die Polaritätseigenschaften des Sols und der organischen Dispersionsphase sind so gewählt, daß zum einen eine stabile Suspension gebildet wird, zum anderen die zugesetzte Lumineszenz-Substanz eine hohe Affinität zu der Sol-Phase besitzt, so dass eine klare Trennung zwischen Sol- und organischer Phase stattfindet und demzufolge sich die zugesetzte lumineszierende Verbindung ausschließlich in der Sol-Phase homogen verteilt.

Der gesamte Herstellungsprozess, einschließlich der Präparation der Silicagel-Sole, erfordert je nach Ansatz einen Zeitaufwand von 20 bis 50 Minuten.

Ausgangspunkt der Synthese der Lumineszenz-Partikel sind Silica-Sole, die nach bekannten Verfahren durch Hydrolyse geeigneter Alkoxysilane in saurem, wäßrigem Milieu gebildet werden. Für das Verfahren und Produkt werden bevorzugt solche Silane eingesetzt, die einen C1 bis C3 Esterrest besitzen. Dies ermöglicht überraschenderweise zusammen mit einer definierten Konzentration der Silane die Herstellung vollkommen transparenter Partikel. Die Konzentrationen der Alkoxysilane im Anfangsansatz liegen zwischen 40 und 90 Vol%, vorzugsweise zwischen 65 und 80 Vol%. Durch Beschallen der Silane in Gegenwart einer wäßrigen Säurelösung, deren Volumenanteil im Silanansatz in der Regel zwischen 10 und 40 Vol% und deren Konzentration in der Regel zwischen 0,01 und 0,5 Mol/Liter beträgt, werden klare Sole gebildet. Die Beschallungszeiten dauern je nach Säurekonzentration 5 bis 20 Minuten. Die so gewonnenen Silica-Sole lassen sich mehrere Tage bei Tieftemperaturen (ca. -18°C) aufbewahren oder können wahlweise sofort weiterverarbeitet werden.

Ein weiteres Merkmal der erfindungsgemäßen Silicagel-Technologie besteht darin, die Porosität der gewonnenen Partikel in weitem Rahmen zu variieren, ein Parameter, den kein anderes aus dem Stand der Technik bekanntes Verfahren in der Weise bietet.

Die Porosität von partikulären Trägermedien spielt bei sämtlichen Bioassays oder Separationsprozessen insofern eine entscheidende Rolle, als die spezifische Nachweisbarkeit des Analyten von dessen Anbindung an die auf dem Träger immobilisierten Liganden- bzw. Rezeptoren abhängt. Das Ausmaß und die Qualität dieses Bindungsprozesses wird direkt von der zugänglichen Oberfläche des Trägers beeinflusst. Letztere wird unmittelbar von der Porosität des Trägers bestimmt. Diese kann überraschenderweise mit Hilfe der erfindungsgemäßen Produkte und Verfahren über den Zusatz bestimmter Stoffe zu dem Sol eingestellt werden. Diese allgemein als Porogene bezeichneten Substanzen werden dem Sol vor der Dispersion zugegeben. Als Zusätze kommen bevorzugt solche Stoffe in Frage, die das Absorptions-Emissions-Verhalten der Träger nicht beeinträchtigen. Die Erfindung nicht einschränkende Beispiele hierfür sind:

Polyethylenglykol, Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polyaminosäuren, Polysaccharide, Proteine oder Polyvinylpyrrolidon. Sie werden während des Dispersions- und Vernetzungsprozesses in die sphärischen Partikel eingekapselt. Der Volumenanteil der organischen Polymerlösungen, die durchweg als 1 bis 10%ige wäßrige Lösungen vorliegen, liegt zwischen 1 und 20 % bezogen auf die Solphase.

Ein weiterer Parameter zur Einstellung der Porosität ergibt sich aus der Auswahl der Zusammensetzung der verschiedenen di- tri- oder tetrasubstituierten Silankomponenten. So weisen Gele aus rein tetrasubstituierten Estern grundsätzlich eine geringere Porosität auf als Sole bzw. Gele, die unter Zusatz von di- oder tri-substituierter Esterverbindungen hergestellt wurden. Durch gezieltes Zumischen der di- oder trifunktionellen Esterverbindungen lassen sich so Porenweiten im Bereich von 50-200 nm realisieren. Die Konzentration der di- und trifunktionellen Silane betragen in der Regel 1-10, vorzugsweise 1 bis 5 Vol%, bezogen auf die Gesamtsilankonzentration.

Ein weiterer, wesentlicher Aspekt der erfindungsgemäßen Produkte und Verfahren besteht darin, die Teilchengröße sowohl über die Art und Weise des mechanischen Rührens als auch über die Viskosität des Silica-Sols zu steuern. Bekannterweise werden die Teilchengrößen bei einer Suspensionspolymerisation über die Rührgeschwindigkeit eingestellt, derart, daß grundsätzlich mit zunehmender Rührgeschwindigkeit die Teilchengröße abnimmt. Der Zusammenhang dieses Parameter trifft auch bei der vorliegenden Erfindung zu, d.h., Rührgeschwindigkeiten >1000 U/Min. führen allgemein zu Teilchengrößen <50 µm, solche von >5000 U/Min. durchweg zu Teilchengrößen <10 µm. Zur Erzielung noch feinerer Partikel im submikrometer Bereich sind Dispergierwerkzeuge, die z.B. nach dem Rotor-Stator-Prinzip arbeiten und eine Rotorgeschwindigkeit von >10.000 U/Min. aufweisen (z.B. Ultra-Turrax®), erforderlich. Auch durch Behandlung mit Ultraschall lassen sich Teilchengrößen im Bereich von 0,5 bis 10 µm realisieren.

Neben der rein mechanischen Einflußgröße konnte gezeigt werden, daß auch die Viskosität des Sols einen entscheidenden Einfluß auf die Partikelgrößen hat. Sinkende Viskosität des Sols führt in der Regel zu einer analogen Verringerung der Teilchengrößen und umgekehrt: steigende Viskositäten führen allgemein zu einer Teilchenvergrößerung. Die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Produkte mit den gewünschten Partikelgrößen von 0,5 bis 50 µm erforderlichen Viskositäten liegen im Bereich von 5 bis 300 cp.

Nach der Präparation des Sols mit den gewünschten Eigenschaften wird im darauffolgenden Schritt der entsprechende Lumineszenzmarker zugesetzt und mit dem Sol innig vermischt, vorzugsweise unter Zuhilfenahme einer Ultraschall-Behandlung. Als lumineszierende Substanzen kommen grundsätzlich solche Verbindungen in Frage, die nach Absorption von Strahlung einer bestimmten Wellenlänge zur Emission von Photonen einer von der Absorptionsfrequenz unterschiedlichen Frequenz befähigt ist und mit dem Silicagel-Sol eine homogene Mischung einzugehen in der Lage ist.

Substanzen dieser Art sind in der als Referenz aufgeführten Literatur vielfältig beschrieben. Die das erfindungsgemäße Produkt nicht einschränkende Beispiele für lumineszierende Moleküle bzw. Marker sind: Fluorescein, Rhodamin, Coumarin, Dansylchlorid, Ethidiumbromid, Texas Red, Phycoerythrin, Oregon Green oder Cascade Blue weiterhin die unter der Handelsbezeichnung BODIPY, SYBR Green, TOTO-1 oder YOYO-1 bekannten Verbindungen sowie die Derivate dieser Produkte. Als Halbleiter-Nanokristalle kommen Verbindungen aus der Reihe II-VI wie z.B.  $\text{MgS}$ ,  $\text{MgSe}$ ,  $\text{MgTe}$ ,  $\text{CaS}$ ,  $\text{CaSe}$ ,  $\text{CaTe}$ ,  $\text{SrS}$ ,  $\text{SrSe}$ ,  $\text{SrTe}$ ,  $\text{BaS}$ ,  $\text{BaSe}$ ,  $\text{BaTe}$ ,  $\text{ZnS}$ ,  $\text{ZnSe}$ ,  $\text{ZnTe}$ ,  $\text{CdS}$ ,  $\text{CdSe}$ ,  $\text{CdTe}$ ,  $\text{HgS}$ ,  $\text{HgSe}$  oder  $\text{HgTe}$  sowie Nanokristalle der Gruppe III-V wie  $\text{GaAs}$ ,  $\text{InGaAs}$ ,  $\text{InP}$  oder  $\text{InAs}$  in Frage. Desweiteren sind auch Halbleiter aus der Gruppe IVA wie z.B. Germanium geeignet.

Geeignete Beispiele für die up-converting phosphore sind Verbindungen aus Seltenen Erden oder Elementen der Gruppe IIIB wie: Na-Yttriumfluorid, Lanthanfluorid, Lanthanoxysulfid, Yttriumoxysulfid, Yttriumfluorid, Yttriumgallat, Gadoliniumfluorid, Barium-Yttriumfluoride, Gadoliniumoxysulfid sowie mit Aktivatorpaaren wie Ytterbium/Erbium, Ytterbium/Thulium oder Ytterbium/Holmium dotierte Verbindungen des obigen Typs. Weiterhin als up-converting phosphore sind Chelat-Verbindungen aus Erbium, Neodymium, Thulium, Holmium und Praseodymium geeignet.

In analoger Weise lassen sich auch lumineszierende Proteine wie Rhodopsin, das grün-fluoreszierende Protein („green fluorescent protein, GFP) sowie Metallporphyrine als Lumineszenz-Substanz einsetzen.

Die Konzentration der zugesetzten lumineszierenden Substanzen kann in weitem Rahmen variiert werden, je nach Erfordernis, die an die betreffende Bioanalytik oder Diagnostik gestellt ist. In der Regel reichen Konzentrationen von 1-10 Gew% der Markersubstanz aus, um eine deutliche Lumineszenz zu erzielen. Diese Konzentrationen übertreffen die bei den herkömmlichen Assays pro Analyt einsetzbaren Lumineszenzmarker-Konzentrationen um mehrere Zehnerpotenzen.

Aufgrund der hervorragenden Mischbarkeit der Silica-Sole mit den verschiedensten Substanzen, hat sich überraschenderweise die Möglichkeit ergeben, zusätzlich zu den Lumineszenz-Substanzen simultan auch magnetische Verbindungen in Form magnetischer Kolloide bzw. Nanopartikel mit einzukapseln. Dies ermöglicht eine völlig neuartige Eigenschaftskombination, die die parallele Nutzung des Lumineszenzeffektes und der magnetischen Abtrennung eröffnet. Hieraus ergeben sich völlig neue Perspektiven für die Entwicklung hocheffizienter Bioarrays, mit denen eine sehr hohe Zahl von Biomolekülen („Molekül-Bibliothek“) ausgetestet werden kann, die den bisherigen, ausschließlich auf Polymer- oder Glassubstraten durchgeführten Arrays verschlossen bleibt.

Als magnetische Substanzen kommen durchweg die bekannten ferro-, ferri- oder superparamagnetischen Substanzen sowie Ferrofluide in Frage, die in der einschlägigen Literatur vielfach beschrieben sind: Br. Patent 1 439 031, Shinkai et al., Biocatalysis Vol 5, 61, 1991, Kondo et al., Appl. Microbiol. Biotechn. Vol. 41, 99, 1994.

Die Konzentrationen der Magnetkolloide werden durchweg so gewählt, daß die Transparenz der Partikel im Hinblick auf das Absorptions- und Emissionsverhalten der Lumineszenzmarker grundsätzlich nicht beeinträchtigt ist. Sie liegen in der Regel zwischen 10 und 30 Gew% bezogen auf die Silicagel-Partikel.

Im dritten Verfahrensschritt werden die Silicagel-Lumineszenzmarker-Mischungen in einer organischen Phase unter Rühren dispergiert. Als Dispergiermittel sind solche Lösungsmittel geeignet, die mit Wasser nicht-mischbar sind und eine stabile Dispersion des Silica-Sols erlauben.

Dispersionsmittel dieser Art sind aus dem Stand der Technik allgemein bekannt und in WO 02/09125 sowie von Laanc et al. („Biocatalysis in Organic Media“, Laanc et al. Hrsg., Elsevier, Amsterdam, pp 65, 1987) beschrieben. Lösemittel, die diese Eigenschaften erfüllen, sind z.B. Hexan, Trichlorethylen, Petroläther, Toluol, Chloroform, 1,1,1-Trichloräthan, Tetrachlorkohlenstoff, Heptan. Auch Mischungen der obigen Lösungsmittel, die eine Dichte von ca. 1 g/cm<sup>3</sup> aufweisen, eignen sich gut zum Dispergieren. Die Volumenverhältnisse organische Phase zu Hydrosol betragen in der Regel 8:1 bis 30:1.

Im Hinblick auf eine engere Größenverteilung der Partikel und auf ein besseres Dispergierverhalten können der organischen Phase eine oder mehrere oberflächenaktive Substanzen in Form von Tensiden, Dispersionsstabilisatoren oder Emulgatoren zugesetzt

werden. Beispiele hierfür sind: Propylenoxid-Äthylenoxid-Blockpolymere, Polyhydroxyfettsäure-Polyäthylenglykol-Blockpolymere, Polyäthylenglykol-Ätherderivate, Sorbitan-Fettsäureester, Blockpolymere aus Rizinsäure-Derivaten, Polyäthylenglykol-Castoröl-Derivate, Polyoxyäthylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester, Alkylphenylpolyäthylenglykol-Derivate, Polyglycerinester, modifizierte Polyester, Polyoxypropylen-Äthylendiamin-Blockpolymere, Polyäthylenglykole, Polyoxyäthylene, Polyoxyäthyl-Alkohol-Derivate. Substanzen dieser Art sind im Handel u.a. unter der Handelsbezeichnung: Renex®, Fatsol®, Prisorine®, Hypermer®, Pluronic®, Tween®, Ithmulgin®, Tripol®, Teconic®, Brj®, Lameform®, Arlasel®, Span®, Dehyuls®, Synergie® oder Triton® bekannt. Die für die Herstellung der Partikel relevanten Tensid-Konzentrationen liegen zwischen 0,1 und 15%, vorzugsweise zwischen 0,5 und 6 Vol- bzw. Gew%.

Im letzten Verfahrensschritt werden die Sole während des Dispergiervorgangs mit einer verdünnten Base versetzt, wodurch erstere zu einem festen Gel polykondensieren. Die Fixierung der Sole zu den gewünschten Gel-Partikeln geschieht in der Regel innerhalb weniger Sekunden (3 bis 20 Sekunden). Dementsprechend erfordert der mechanische Dispergiervorgang auch nur wenige Sekunden. Der Gelbildungs- sowie der parallele mechanische Dispergierprozess ist dabei um so kürzer, je höher die gewählte Basenkonzentration ist. Als Base wird vorzugsweise Ammoniak in Form einer 1 bis 12%igen wässrigen Lösung verwendet, andere Basen, wie z.B. NaOH, Diäthylamin oder KOH, können grundsätzlich auch eingesetzt werden. Die Volumenverhältnisse Base zu Sol liegen üblicherweise zwischen 1:2 und 1:4. Infolge der äußerst rasch verlaufenden Gellierungsreaktion wird der gesamte Partikel-Herstellungsvorgang einschließlich der Einkapselung der Lumineszenzmarker innerhalb von einer Stunde bewerkstelligt. Dies stellt gegenüber allen herkömmlichen Verfahren zur Herstellung lumineszierender Partikel eine Zeitersparnis von bis zu 90% dar.

Dem Herstellungsprozess schließen sich mehrere Waschungen mit Alkohol und Wasser an. Die erhaltenen Magnetträger werden üblicherweise in Wasser aufbewahrt. Danach können die gewonnenen Silicagel-Partikel direkt zur weiteren Funktionalisierung herangezogen werden.

Zur Ankopplung der Lumineszenz-Partikel an die entsprechenden Biomoleküle wie Proteine, Enzyme, Peptide, Enzyme, Nukleinsäuren, Oligosaccharide, die durchweg als Zielsubstanzen, Marker, Bioliganden oder Analyt-Sonden fungieren, werden die holländisch bekannten Kopplungs- und Kopplungsverfahren für Silicagel- bzw. silanisierter Träger verwendet. Dazu

14

gehören die Umsetzungen mit funktionellen Alkoxygruppen, die z.B. über Amino-, Epoxy-, Mercapto-, Isothiocyanat-, Acryl- oder Halogen-Gruppen verfügen. Beispiele für solche Aktivierungs- bzw. Kopplungszentren sind: 3-Aminopropyl-triethoxysilan, 3-Aminopropyltrimethoxysilan, 3-Glycidylpropyltrimethoxysilan, 3-Glycidylpropylmethoxydimethoxysilan, 3-Mercaptopropyl-trimethoxysilan, 3-Isothiocyanatpropyl-triethoxysilan, Methacryloxypropyl-triethoxysilan, Chlorpropyl-triethoxysilan. Auch die Einführung von Carboxyl-, Hydroxyl oder Aldehyd-Gruppen über eine entsprechende Derivatisierung der obigen Alkoxygruppen z.B. mit Amino-carbonat, Glutaraldehyd oder Hydrolyse der Epoxy-Gruppen mit Säuren oder Basen zum Hydroxy-Derivat ist allgemein aus dem Stand der Technik bekannt. Ebenso führt die Umsetzung der Epoxy-aktivierten Träger u.a. mit Carbonat, Sulfon, Thio-sulfon, Amino-substituierten Carbonat wie z.B. Nitrilotriessigsäure oder Imidodessigsäure nach den bekannten Verfahren zu einem Metallchelat-Träger. Auch die Aktivierung der Silicagel-Partikel über photoaktive, beispielsweise Arylazid- oder Diazirin-tragende Agenzien, die durch UV-Strahlung zunächst an den Träger gekoppelt und anschließend mit dem Biomolekül abregieren können, sind ebenfalls nach der Weise durchführbar. Substanzen dieser Art sind z.B.: N-Hydroxysuccinimidyl-4'-azidobenzoat, [2-Nitro-4-[3-(trifluormethyl)-3H-diazirin-3-yl]phenoxy]acetyl-N-hydroxysuccinimidat, N-Hydroxysuccinimidyl-(4-azidophenyl)-1,3'-dithio-propionat, N-[m-[3-(trifluormethyl)diazirin-3-yl]phenyl]-4-maleimidobutyramid.

Auf eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen Aktivierungen, Funktionalisierungen sowie Kopplungen kann an dieser Stelle verzichtet werden, da die speziellen Reaktionsmethoden allgemein bekannt sind und von einem Fachmann auf diesem Gebiet jeder Zeit genutzt werden können (vgl. Vansant et al., in: „Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface“, Hrsg. Delmon und Yates, Elsevier, Amsterdam, 1997; „Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers“, Häfeli et al. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 1997; Shriver-Leko in: „Immobilized Biomolecules in Analysis“, Cass und Ligler Hrsg., Oxford University Press, 1998; WO 99/01766; Lottspeltch und Zorbas Hrsg., in: „Bioanalytik“, Spektrum Verlag, Heidelberg, 1998). Die erwähnten prinzipiellen Ausführungsformen sind daher in keiner Weise als limitierende Offenbarungen aufzufassen.

Die Anwendung der erfindungsgemäßen Lumineszenz-Partikel erstreckt sich auf sämtliche Gebiete der Biopolytik und Diagnostik, die zum Nachweis oder Quantifizierung spezifischer Substanzen bzw. Analyten eine Reaktion, die Lumineszenz oder Radioaktivität nutzen. Beispiele hierfür sind der Immunoassay in Form des Radio- oder des Enzymimmunoassays, der

Nukleinsäurenachweis, die Protomanalyse, die DNA-Sequenzierung, der Phage-Display, die Zellmarkierung, der Nukleinsäure-Array oder die Zellmarkierung. Ferner lassen sich die partikulären Lumineszenzmarker in der Durchflußzytometrie bzw. im fluoreszenzaktivierten Zellsorter (fluorescence-activated cell sorter, FACS®) oder beim Durchtesten von DNA- oder Protein-Bibliotheken einsetzen.

In den nachfolgenden Beispielen werden die erfindungsgemäßen Produkte und Verfahren näher beschrieben, ohne diese zu begrenzen.

### Beispiel 1

5 ml Tetramethoxysilan werden zusammen mit 2 ml 0,05 M HCl in einem Ultraschallbad für 10 Minuten bei Raumtemperatur beschallt. 2 ml des gewonnenen klaren Sols werden mit 1 ml 0,05 %iger Rhodamin B-Lösung versetzt. Die erhaltene Mischung wird in 25 ml 0,4 ml Korantin (BASF) enthaltendem Hexan eingetragen. Der Ansatz wird mit einem Dispergierwerkzeug (Ultra-Turrax) für 3 Sekunden bei 20.000 U/min. dispergiert. Nach erfolgter Zugabe von 1 ml 1%ige Ammoniak-Lösung wird noch 5 Sekunden weiter dispergiert. Nach weiteren 5 Minuten werden die Teilchen mittels 2minütiger Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wird abdekantiert und je dreimal mit je ca. 10 ml Ethanol, Aceton und Wasser nachgewaschen. Es werden Lumineszenzpartikel mit einer Teilchengröße von 1-3 µm gewonnen.

Die gewonnenen Teilchen werden anschließend mehrfach mit wasserfreiem Toluol gewaschen und anschließend unter Argonatmosphäre mit 5 ml wasserfreiem Toluol und 2 ml 3-

Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan 3 Stunden bei 90°C unter Rühren umgesetzt. Danach wird fünfmal mit Toluol und Aceton nachgewaschen.

100 mg des gewonnenen Produktes werden sodann dreimal mit 0,5 molarem Phosphat-Puffer, pH 8,5, gewaschen und anschließend mit 2 ml desselben Puffers, in dem 10 mg Streptavidin gelöst sind, bei 40°C 5 Stunden inkubiert. Das Produkt wird anschließend fünfmal unter Anwendung eines jeweiligen Zentrifugationsschrittes mit 0,05 M Phosphat-Puffer, pH 7,2 gewaschen. Zur Blockierung restlicher Epoxy-Gruppen wird das gekoppelte Produkt 24 Stunden in 1%iger Äthanolamin-Lösung, die 0,1% Serum Albumin enthält, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Danach erfolgt mehrfaches Waschen mit 0,05 Tris/HCl-Puffer, pH 8,0.



Es resultiert ein Produkt, das zur Bindung bzw. Markierung biotinylierter Biomoleküle eingesetzt werden kann.

### Beispiel 2

2 ml des analog Beispiel 1 hergestellten Silica-Sols, werden mit 10 mg nach einer Vorschrift von Sooklal et al. (Adv. Mater., Vol. 10, 1083, 1998) synthetisierten CdS-Halbleiter-Nanokristallen, die eine mittlere Teilchengröße von 138 nm aufweisen, vermischt und anschließend 2 Min. bei Raumtemperatur beschallt. Die Mischung wird in 25 ml Toluol, das je 2,5 Vol% Span 60 und 0,5 Vol% Tween 80 gelöst enthält, mit Hilfe eines Ultra-Turrax bei 20.000 U/min. 5 Sekunden dispergiert. Nach Zugabe von 1 ml 6%iger Ammoniak-Lösung wird noch 5 Sekunden weiter dispergiert. Es folgt die Separation und Aufarbeitung der Partikel analog Beispiel 1. Es werden Lumineszenzpartikel mit einer mittleren Teilchengröße von 3,6 µm gewonnen, deren Emissionsmaximum bei 510 nm liegt.

Zur Aktivierung der Teilchen werden 75 mg Lumineszenzpartikel in Gegenwart von [2-Nitro-4-[3-(trifluormethyl)-3-yl]phenoxy]acetyl-N-hydroxysuccinimidat (Ansatz: 5 mg gelöst in 0,5 ml Lithanol-Wasser (1:1)), mit Hilfe des Stratalinker UV 2400 (Stratagene) für 20 Minuten bestrahlt. An das aktivierte Produkt können nach entsprechendem Waschvorgang mit Äthanol und Wasser Aminogruppen-haltige Biomoleküle, Liganden oder Rezeptoren wie Nukleinsäuren, Proteine oder Antikörper nach den bekannten Methoden (Matson und Little, J. Chromatogr., Vol. 458, 67, 1988) gekoppelt werden.

### Beispiel 3

0,5 ml Tetrathoxysilan werden mit 0,1 ml Wasser und 0,08 ml 0,1 M HCl vermischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad beschallt. 0,2 ml des gewonnenen Sols werden mit 5 mg (YYbEr)2O2S, das nach einer Vorschrift von Hampl et al. (Anal. Biochem., Vol. 288, 176, 2001) hergestellt wurde, vermischt und 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Der Mischung werden sodann 30 mg Magnetit-Pulver (Bayferrox 318M, Fa. Bayer, FRG) zugesetzt. Die Mischung wird nochmals für 2 Minuten beschallt. Die Mischung wird anschließend unter Rühren (Ultra-Turrax) bei 12.000 U/min in 3 ml Trichlorethylen, in dem 2 Vol% Dehymuls HRE7® und 0,5 Vol% Prisorine 3700® gelöst sind, dispergiert. Während des



Dispergiervorgang werden 0,08 ml 6%ige wäßrige Ammoniaklösung zugefügt. Es wird noch weitere 5 Sekunden weitergeführt. Separation und Aufarbeitung der gewonnenen Lumineszenzpartikel erfolgt analog Beispiel 1.

Man erhält Lumineszenzpartikel mit einer mittleren Größe von 6,7  $\mu\text{m}$ .

Das 3 Stunden im Vakuum getrocknete Produkt wird fünfmal mit getrocknetem Toluol nach jeweiliger magnetischer Abtrennung gewaschen und anschließend 12 Std. nach Zugabe von 3 ml Toluol und 0,25 ml 3-Aminopropyltriäthoxysilan am Rückfluß gekocht. Die Magnetpartikel werden wieder magnetisch abgetrennt und mit ca. 5 ml Toluol und Chloroform 3-mal gewaschen. Es folgt eine mehrstündige Trocknung im Vakuum. Das aminomodifizierte Produkt wird anschließend mit 6%iger Glutaraldehyd-Lösung in 4 ml 0,1 M Na-Carbonat-Puffer, pH 9,0, für 2 Std. bei 35°C umgesetzt. Es wird anschließend mit 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,2, intensiv nachgewaschen.

An die gewonnenen Aldehyd-funktionalisierten Lumineszenzpartikel können anschließend nach den bekannten Verfahren Aminogruppen-tragende Biomoleküle wie Proteine, Peptide oder am 5'-Ende mit Aminogruppen substituierte Nukleinsäuren oder Oligonucleotide nach den bekannten Verfahren gekoppelt werden. Die so funktionalisierten Lumineszenzpartikel lassen sich als Sonden in Protein-oder Nukleinsäure-Arrays einsetzen.

Erfinder: Müller-Schulte; Detlef, Dr. 52074 Aachen, DE

#### Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft sphärische, transparente Silicagel-Partikel mit hoher Lumineszenz, die durch Einkapseln einer oder mehrerer verschiedener lumineszierender Substanzen in eine Silicagel-Matrix erzeugt wird. Durch Variation der Konzentration der lumineszierenden Substanzen sowie durch Einkapseln von Substanzen unterschiedlicher Emissionsfrequenz lassen sich die Partikel als multiplexe Kodierungs- bzw. Markersysteme in der Bioanalytik und der Diagnostik einsetzen.

## Patentansprüche

1. Lumineszierende, transparente Silicagel-Partikel ohne Eigenfluoreszenz, in die eine oder mehrere lumineszierende Substanzen eingekapselt sind,
2. Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden Substanzen eine Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Chemielumineszenz, Elektrolumineszenz oder einen Lumineszenz-Energietransfer aufweisen.
3. Partikel nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der eingekapselten lumineszierenden Substanzen variierbar ist.
4. Partikel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten lumineszierenden Substanzen unterschiedliche Emissionsfrequenzen aufweisen.
5. Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die lumineszierenden eingekapselten Substanzen Moleküle sind, deren Anregungsfrequenz höher ist als die Emissionsfrequenz.
6. Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten lumineszierenden Substanzen aus Halbleiter-Nanokristallen bestehen, die aus Elementen der Gruppe IIIA und VA, Gruppe IIB und VIA oder Gruppe IVA gebildet sind.
7. Partikel nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten lumineszierenden Halbleiter-Nanokristalle mit Kupfer- und/oder Silberzusätzen dotiert sind.
8. Partikel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten lumineszierenden Substanzen Anregungsfrequenzen aufweisen, die niedriger als die Emissionsfrequenzen sind.
9. Partikel nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten lumineszierenden Substanzen mikrokristalline Verbindungen aus Seltenen Erden und/oder Yttrium mit Elementen aus der Gruppe VIA und/oder VIIA sind.

10. Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten lumineszierenden Substanzen Metall-Chelatverbindungen sind, deren Zentralatom aus der Gruppe VII, IB, IIB oder der Gruppe der Seltenen Erden ausgewählt ist.
11. Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten, lumineszierenden Substanzen Pyrrolfarbstoffe sind.
12. Partikel nach Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die eingekapselten, lumineszierenden Substanzen lumineszierende Proteine sind.
13. Lumineszierende transparente Polymerpartikel ohne Eigenfluoreszenz gemäß Ansprüchen 1 bis 12, in die ein magnetisches Kolloid miteingekapselt ist.
14. Partikel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das magnetische Kolloid aus ferro-, ferri- oder superparamagnetischen Verbindungen oder Ferrofluiden besteht.
15. Partikel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das magnetische Kolloid in einer Konzentration von 10-50 Gew%, bezogen auf das Polymerpartikel, vorliegt.
16. Partikel nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Silicagel funktionelle Gruppen aufweisen, die mit Proteinen, Peptiden, Zellrezeptoren, Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Fragmenten, Polysacchariden, Oligosacchariden, Antikörpern, Antikörper-Fragmenten, Streptavidin, Avidin, Biotin und/oder Enzymen koppelbar sind.
17. Verfahren zur Herstellung lumineszierender, transparenter Silicagel-Partikel ohne Eigenfluoreszenz gemäß Ansprüchen 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß
  - a) eine Mischung bestehend aus einer verdünnten Säure und Alkoxysilanen zu einem klaren Silica-Sol kondensiert wird,
  - b) das klare Silica-Sol mit einem oder mehreren lumineszierenden Substanzen homogen vermischt wird,
  - c) die Sol-Lumineszenz-Substanz-Mischung in einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase dispergiert und

- d) die Sol-Lumineszenz-Substanz-Mischung während oder nach dem Dispergiervorgang durch Zugabe einer Base vernetzt wird.
18. Verfahren zur Herstellung lumineszierender, transparenter Silicagel-Partikel gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Sol-Lumineszenz-Substanz-Mischung 10-50 Gew% einer ferro-, ferri- oder superparamagnetischen Substanz zugesetzt werden.
19. Verfahren zur Herstellung lumineszierender, transparenter Silicagel-Partikel gemäß Ansprüchen 17 und 18, dadurch gekennzeichnet, daß die mit Wasser nicht mischbare organische Phase 0,1 bis 10 Vol% eine oder mehrere oberflächenaktive Substanz(en) gelöst enthält.
20. Verfahren zur Herstellung lumineszierender, transparenter Silicagel-Partikel gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Volumenverhältnis Sol zu organischer Phase 1:5 bis 1:30 beträgt.
21. Verfahren zur Herstellung lumineszierender, transparenter Silicagel-Partikel gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Dispersions-Vernetzungsvorgang 2 bis 30 Sekunden dauert.
22. Verfahren zur Herstellung lumineszierender, transparenter Silicagel-Partikel gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß dem Sol vor dem Dispergiervorgang 1- 20 Vol% einer wäßrigen Lösung eines organischen Polymeren, Polysaccharids oder Proteins zugemischt werden.
23. Verwendung der lumineszierenden Silicagel-Partikel nach Ansprüchen 1 bis 16 für die Analyse und/oder Diagnostik von Nukleinsäuren, Nukleinsäure-Fragmenten, Proteinen, Peptiden, Antikörpern, Antikörper-Fragmenten, Zellen, Zellrezeptoren, biotinylierten Biomolekülen sowie für die Durchtestung von Protein- oder Nukleinsäure-Bibliotheken, als Sonden im Rahmen der Array-Technologie oder für die Nukleinsäure-Sequenzierung.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**